

**Untersuchungen über die
zellkonservierende Wirkung
von Cortison**

Irmgard Ulsamer

1962

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a.M.

(Direktor: Prof. Dr. F. Hoff)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZELLKONSERVIERENDE WIRKUNG VON CORTISON

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

der hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Irmgard U l s a m e r
aus Frankfurt a.M.

Frankfurt a.M. 1962



Dekan: Prof.Dr. K. Herzberg
Referent: Prof. Dr. H. Fischer
Korreferent: Prof. Dr. A. Wacker
Mündl.Prüfung: 15.Februar 1962

INHALTSVERZEICHNIS

A.	<u>Einleitung</u>	2
B.	<u>Hauptteil</u>	7
I.	Methoden:	7
1.	Gewinnung der Leukocyten	7
2.	Gewinnung der Lymphocyten aus Thymus	7
3.	Gewinnung der Thrombocyten	8
4.	Dauerinkubation in steroidhaltigen Medien	8
5.	Analyse des Grades der Zellzerstörung mit Hilfe der Folin-Ciocalteu Reaktion	9
6.	Mikroskopische Beobachtungen und Sterilitätskontrollen	9
7.	Methode der Versuche mit Bohnenkeimlingen	10
II.	Ergebnisse:	11
1.	Versuche mit Lymphocyten und lymphoiden Zellen	11
2.	Versuche mit neutrophilen Granulocyten und myeloisch-leukämischen Zellen	15
3.	Versuche mit Thrombocyten	22
4.	Versuche mit Bohnenkeimlingen	26
III.	Diskussion	23
C.	<u>Zusammenfassung</u>	33

A. EINLEITUNG

Cortison und andere Glucocorticoide beeinflussen die Zusammensetzung des peripheren Blutbildes in mehrfacher Weise. Diese Wirkung ist bekannt und öfter beschrieben, in ihrem Wesen aber noch ungeklärt.

Der wohl eindruckvollste Effekt ist der nach hohen pharmakologischen Dosen einsetzende Lymphocytensturz. Einer der ersten Forscher, der eine Lymphocytenzerstörung in vivo unter vermehrter Nebennierenrindencorticoidausschüttung beobachtete, war D o u g h e r t y (1), der den Begriff der "Lymphocytolyse" prägte. Wie V a l e n t i n e , C r a d d o c k und L a w r e n c e (6) fand D o u g h e r t y nach Cortisoninjektionen eine Lymphopenie im peripheren Blut. Zu ähnlichen Befunden kamen H i l l s und Mitarbeiter (3). Eine einmalige ACTH-Injektion von 25 mg i.m. rief beim Menschen häufig einen Lymphocytenabfall hervor. Auch F i n c h und Mitarbeiter (4) konnten beim Menschen durch eine ACTH-Gabe von 40 mg oder 100 mg Cortison eine Lymphopenie erzeugen. Regelmässig vorhanden war der Lymphocytenabfall im Blut in den Experimenten von Q u i t t n e r und Mitarbeitern (5). Die subkutane Injektion von 2,5 mg Cortison rief bei Mäusen eine prompte und neun Tage andauernde Lymphopenie hervor. Den gleichen Effekt erzielten ebenfalls bei der Maus W e n c k und S p e i r s (6). Hier war die ursprüngliche Lymphocytenzahl erst nach 29 Tagen wieder erreicht. Auch G r u n d m a n n (7) sah in vivo am Meerschweinchen eine primäre Lymphocytenzerstörung

durch Cortisoninjektion. Gerstner und Gordon (8) behandelten hypophysektomierte Ratten mit Cortison. Die während der Behandlungszeit abgesunkenen Lymphocytenzahlen stiegen nach Beendigung der Cortisongaben wieder stark an.

Parallel zu der Abnahme der Lymphocyten nach Cortisongaben erfolgt auch ein Sturz der Eosinophilen. Derartige Befunde am Menschen erhoben Wenck und Speirs (6), Gerstner und Gordon (8), Bunim (9) und Finch (4). Zu den gleichen Ergebnissen an Affen, Hunden, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen kamen Giroud (10) und andere.

Nicht ganz so regelmässig, aber öfter beschrieben, ist die Erhöhung der neutrophilen Granulocyten unter hohen Cortisongaben. Von dieser Zunahme der Neutrophilen unter Cortison und dem etwa gleich wirkenden Hydrocortison berichten Thorn (11) und Mitarbeiter, Yoffey (12), Larizza (13) und Mitarbeiter. Hills und Mitarbeiter (3) erhielten nach einer einmaligen ACTH-Injektion (25 mg) beim Menschen ebenfalls einen Leukocytenanstieg. Das gleiche Bild riefen Hills, Forsham und Finch (3) hervor durch Injektion von 20 mg 17-Hydroxycorticosteron bei Patienten mit Addison'scher Krankheit. Ebenfalls löste Dury (14) eine neutrophile Leukocytose durch Cortisongabe bei adrenaletomierten Ratten aus. Auch Laves (15) konnte sechs Stunden nach Cortisoninjektion einen Granulocytenanstieg feststellen. Giroud, Domenech und Slimane -

T a l e b (16) erzeugten bei Affen und Ratten sowohl durch ACTH (12,5 mg bzw. 5,0 mg) als auch durch Cortison (50 mg bzw. 10 mg) neutrophile Leukocytosen. Am Menschen erhielten F i n c h und Mitarbeiter (4) den gleichen Befund nach Injektion von 40 mg ACTH oder 100 mg Cortison. Endlich fanden G e r s t n e r und G o r d o n (8) einen Abfall der neutrophilen Granulocyten nach Sistieren der Cortisonbehandlung bei hypophysenlosen Ratten. Diese Neutrophilie unter Cortison ist jedoch keineswegs ein konstanter Befund. Sie kann sogar fehlen oder sich unter länger dauernder Behandlung zurückbilden. A s c h k e n a s y (17) fand nach Injektion von 25 mg Cortison einen Rückgang der Neutrophilenzahl. W e n c k und S p e i r s (6) beobachteten am ersten Tag nach der Injektion von 2,5 mg Cortison an Mäusen zunächst einen Leukocytensturz und erst anschliessend einen Anstieg bis weit über die Höhe der Ausgangswerte der Granulocyten. Q u i t t n e r und Mitarbeiter (5), sowie S t e v e n s und T o o n e (18) lösten durch die für Mäuse sehr hohe Dosis von 2,5 mg Cortison eine Granulocytopenie aus.

Der häufig zu erhebende Befund der neutrophilen Leukocytose unter Cortison-Therapie scheint zunächst im Widerspruch zu stehen zu den Remissionen mit Verschwinden der unreifen Zellformen aus dem Blut, die man bei der Behandlung myeloischer Leukämien erzielen kann. Nach H e i l m e y e r (19) ist jedoch nur die Behandlung der unreifzelligen Blastenleukämien von Erfolg. Auch C r a m e r (20) misst dem Reifegrad der leukämischen Zellen für das Ansprechen der Cortison-Therapie massgebliche Bedeutung.

zu. Auch G r o ß und L u d w i g (21) erreichten bei akuten Leukämien mit hochdosiertem Cortison einen starken Abfall der unreifen Zellformen im Blut.

Über das Verhalten der Thrombocytenzahlen liegen nur wenige Hinweise vor. Jedoch stellten de T a k a t s (22), K ö l l e r und Z o l l i k o f e r (23) und C o s t e und Mitarbeiter (24) eine Vermehrung der Blutplättchen nach ACTH oder Cortison fest. Nach Blutungen fand B o u n a m e a u x (25) unter Cortison ein beschleunigtes Wiederansteigen der Thrombocytenzahlen bei Kaninchen. Auch O b e r d i s s e (26) und H a n s e n (27) beobachteten einen Anstieg der Thrombocytenzahlen nach Cortisongaben.

Schliesslich ist die Erhöhung der Erythrocytenzahlen nach verstärkter Nebennierenrindenhormonausschüttung oder nach pharmakologischen Cortisondosen von einigen Autoren beschrieben worden. F i n c h (4) erhielt bei mit 40 mg ACTH oder 100 mg Cortison behandelten Patienten eine Vermehrung der Erythrocyten. Beim Kaninchen fand B o u n a m e a u x (25) nach Blutungen unter Cortison ein sehr rasches Wiedererreichen der ursprünglichen Erythrocytenzahlen. Ähnlich sind die Ergebnisse H a n s e n s (27), der bei Patienten mit erworbenen hämolytischen Anämien unter Cortisonbehandlung einen bedeutenden Anstieg der Erythrocyten erzielte.

Obwohl wir uns darüber im Klaren sind, dass es sich bei den Ursachen, die zu den geschilderten Blutbildveränderungen unter Cortison führen, um einen vielschichtigen,

sehr komplexen Vorgang handelt, fragen wir uns: Lässt sich ein Teil dieser Veränderungen mit in vitro-Versuchen durch direkte Einwirkung des Cortisons auf die Zellen erklären ?

Um festzustellen, ob Versuche mit pflanzlichen Zellen zu ähnlichen oder vergleichbaren Resultaten führen, untersuchten wir die direkte Einwirkung des Cortisons auch auf Bohnenkeimlinge.

B. H A U P T T E I L

I. M e t h o d e n

1. Gewinnung der Leukocyten:

Wir verwandten Blut von Patienten mit neutrophiler Leukocytose, Lymphocytose, myeloischer Leukämie und lymphatischer Leukämie. Das steril aus der Vene entnommene Blut wurde pro Röhrchen mit 2 Tropfen Heparin (Liquemin "Roche") ungerinnbar gemacht und mit $\frac{1}{3}$ der Gesamtblutmenge einer 3 %-igen Lösung von Kollidon in physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Nach ungefähr 1 Stunde wurde der Überstand, in dem sich die Leukocyten befinden, zentrifugiert. Wir resuspendierten die Leukocyten in physiologischer Kochsalzlösung. Durch einige Minuten langes Schütteln entstand eine homogene Suspension.

2. Gewinnung der Lymphocyten aus Thymus:

Kalbthymus wurde steril mit der Schere zerkleinert. Die ungefähr 1 cm^3 grossen Stücke werden in 1:10 mit NaCl verdünnter Complexonlösung (EDTA=Äthylendiamintetraessigsäure="Titriplex" Merck (1 mM) aufgeschüttelt, eine schonende Methode, durch die sich die Lymphocyten leicht und unbeschädigt aus dem Gewebe herauslösen lassen. Die durch den Lymphocytengehalt milchig getrübbte EDTA-Lösung enthielt ausserdem noch wenige Gewebsreste, die wir durch Kolieren durch sterilen Mull entfernten. Danach wurde zentrifugiert (5 Minuten bei 2000 U/Min.), der Überstand verworfen und das Sediment in dem gewünschten Volumen physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

3. Gewinnung der Thrombocyten:

Bei der Thrombocyten-gewinnung arbeiteten wir bei 4°C im Kühlraum. Schweineblut wurde mit 1/10 der Gesamtblutmenge EDTA-Lösung (Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure, "Titriplex" Merck 1 mM) ungerinnbar gemacht und nach dem Absetzen der Hauptmasse mit Erythrocyten 5 Minuten bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Das Plasma, das die Thrombocyten, die Leukocyten und noch einen Teil der Erythrocyten enthält, wurde abgehebert und nochmals 10 Minuten bei 200 U/Min. zentrifugiert; dadurch wurden Erythrocyten und Leukocyten weitgehend eliminiert. Der thrombocytenreiche Überstand wurde dann mit einer 10 %-igen Lösung von EDTA in physiologischer Kochsalzlösung versetzt und 20 Minuten bei 2800 U/Min. zentrifugiert. Wir schüttelten das Sediment, das zum grössten Teil aus Thrombocyten besteht in 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnter EDTA-Lösung 10 bis 20 Minuten auf und stellten so eine homogene Thrombocyten-suspension her.

4. Dauerinkubation in steroidhaltigen Medien:

Als Inkubationsmedium verwandten wir physiologische Kochsalzlösung. Die Zellsuspensionen wurden unter sterilen Kautelen in Hydrocortisonlösungen (Solu-Decortin H Merck) verschiedener Konzentrationen bei 37°C inkubiert. Die Endkonzentrationen des Steroids betrugen 0,001 bis 5,0 mM. Zwei - in einem Versuch drei - Parallelansätze dienten für die verschiedenen Inkubationszeiten, 24, 48 und 72 Stunden.

5. Analyse des Grades der Zellzerstörung mit Hilfe der Folin Ciocalteu Reaktion:

Mit der Folin-Ciocalteu Reaktion wird Thyrosin qualitativ und quantitativ nachgewiesen. In unseren Versuchsansätzen wird neben anderen Aminosäuren Thyrosin als Folge von Zelltod und Proteolyse frei. Die Menge des freigewordenen Thyrosins kann daher als Mass für den Grad des Zellunterganges dienen:

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1,0 ml des zellfreien Überstandes in ein Reagenzglas gegeben. Nach Hinzufügen von 3,0 ml einer 12,5 %-igen Na_2CO_3 -Lösung und 0,5 ml einer 0,1 %-igen CuSO_4 -Lösung wurde geschüttelt und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C ins Wasserbad gebracht. Danach wurde 1,0 ml des 1:3 verdünnten Folin-Reagenz hinzugegeben (1 Teil Folin-Reagenz frisch gelöst in 2 Teilen aqua dest.) und gut gemischt. Nach weiteren 20 bis 30 Minuten wurden die Extinctionen bei 546mm μ gegen einen Leerwert (1,0 ml H_2O , dem die gleichen Reagentien hinzugefügt worden waren) gemessen.

6. Mikroskopische Beobachtungen und Sterilitätskontrollen:

Vor Inkubation der Zellen überzeugten wir uns stets von ihrer morphologischen Intaktheit. Ausstriche wurden nach Pappenheim gefärbt. Meist jedoch wurden die Zellen ungefärbt im Phasenkontrastmikroskop beobachtet.

In vielen Ansätzen wurden Sterilitätskontrollen auf Blutagar oder in Bouillion-Lösung durchgeführt.

Morphologisch nicht intakte Zellsuspensionen und nicht sterile Ansätze wurden verworfen.

7. Methode der Versuche mit Bohnenkeimlingen:

Wir liessen Bohnenkerne gleicher Grösse (Feuerbohnen und Blumenbohnen) 3-4 Tage in feuchtem Torf keimen. Danach wurden die etwa gleich weit entwickelten Keimlinge unter fliessendem Wasser gewaschen und in gleiche Volumina verschieden konzentrierter Steroidlösungen gebracht. Wir verwandten Prednisolon und das nicht antiphlogistisch wirkende 11-epi-Hydrocortison in Konzentrationen von 1,0, 2,5 und 5,0 mM. Nach 5-7 Tagen Versuchsdauer wurden die bisher in den Steroidlösungen keimenden Bohnen gewaschen und für weitere 5 Tage in Wasser gelegt. Bei einer Versuchsreihe wurden die Bohnen nach der Vorkeimung in zweitägigem Abstand gewägt und die prozentuale Gewichtszunahme ermittelt.

Es wurden Fotos hergestellt und über Beobachtungen Protokoll geführt. Von Haupt- und Seitenwurzeln wurden histologische Schnitte angefertigt.

II. Ergebnisse

1. Versuche mit Lymphocyten und lymphoiden Zellen:

Um das Verhalten von Lymphocyten und lymphoiden Zellen in verschiedenen Steroidkonzentrationen zu untersuchen, wurde so verfahren, daß die angereicherten weißen Blutzellen von Patienten mit sehr hohem Blutlymphocytengehalt in verschiedenen Steroidkonzentrationen bei 37° mit steriler physiologischer Kochsalzlösung inkubiert wurden.

Das Ergebnis eines solchen Versuches mit lymphoiden Zellen eines Patienten mit Pfeiffer'schem Drüsenfieber ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Auf der Ordinate sind die mit der Folin-Ciocalteu-Reaktion gewonnenen Extinctionswerte, praktisch das Maß der Zellschädigung, wiedergegeben. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Konzentrationen des Prednisolons im Versuchsansatz aufgetragen.

Es zeigt sich hier in eindeutiger Weise, daß sowohl nach 17 wie nach 40 Stunden Inkubationsdauer die Kontrollansätze den geringsten Gehalt an Thyrosin im Überstand aufweisen, während dieser mit steigendem Steroidgehalt zunimmt, also ein Zeichen der stärkeren Zellzerstörung.

EXTINCTION 546 m μ

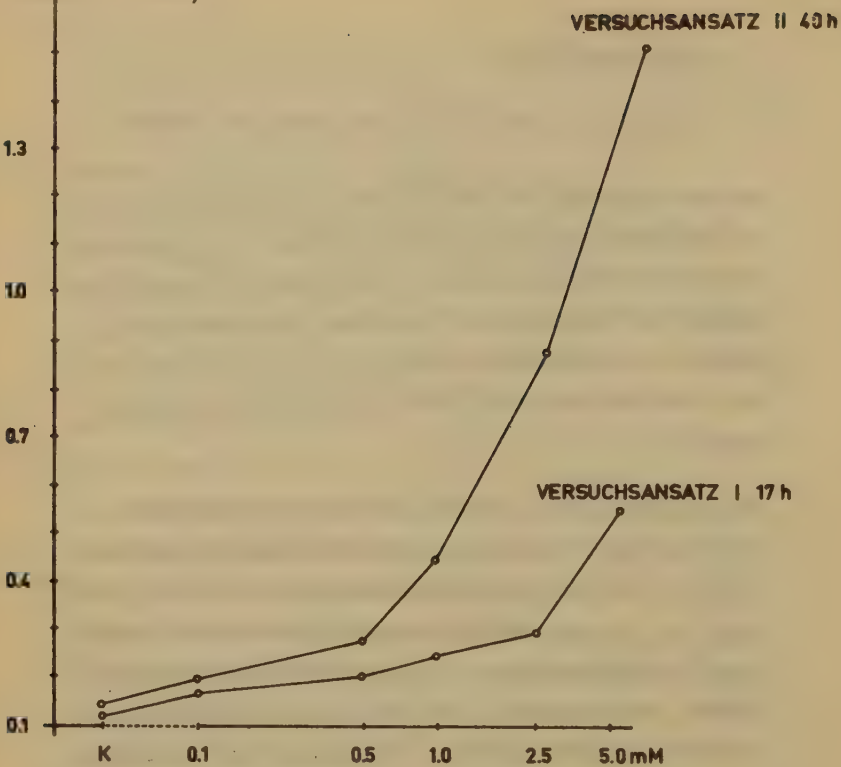


Abb. 1 Lymphocyten eines Patienten mit Pfeiffer'schem Drüsenfieber (12000 Leukocyten/cmm Blut, davon 80% Lymphocyten) wurden in Prednisolonlösungen verschiedener Konzentrationen (0,1 bis 5,0 mM) inkubiert.

Ein typisches Versuchsergebnis mit lymphatisch leukämischen Zellen zeigt Abbildung 2.

In Übereinstimmung mit Versuch 1 konnten wir auch hier feststellen, daß der Thyrosingehalt der Kontrollen am niedrigsten war, während er mit steigenden Prednisolonzkonzentrationen anstieg.

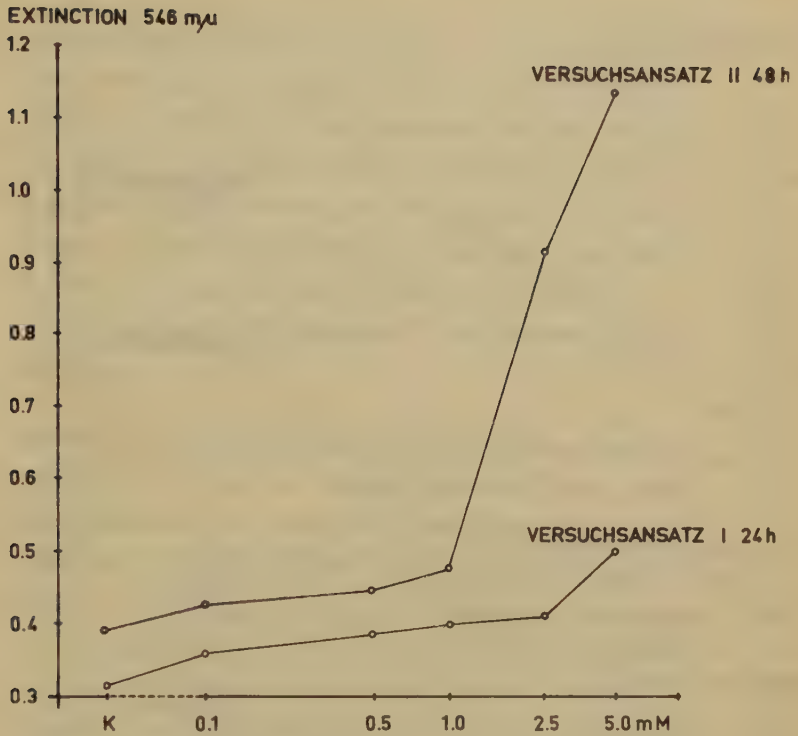


Abb. 2 Inkubation von Lymphocyten eines Patienten mit lymphatischer Leukämie in Prednisolon (0,1-5,0 mM)

Um mit einer möglichst reinen Lymphocytensuspension zu arbeiten, verwandten wir nun Kalbs-Thymocyten. Das Resultat ist in Abbildung 3 und 4 wiedergegeben.

Es zeigt sich auch hier deutlich, daß Thymocyten-je höher die Steroidkonzentration desto stärker-geschädigt werden.

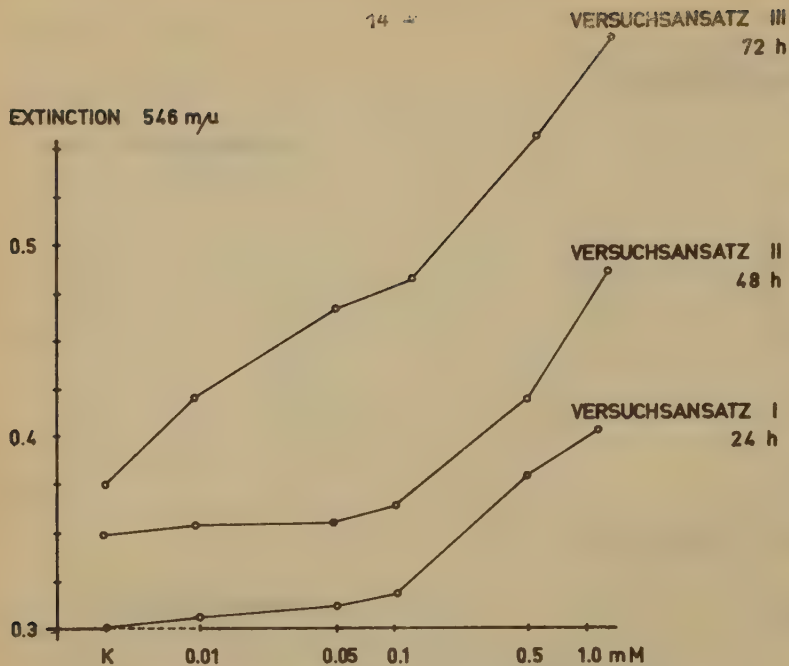


Abb. 3 Inkubation von Thymocyten (Kalb) in Prednisolonlösungen (0,01-1,0 mM)

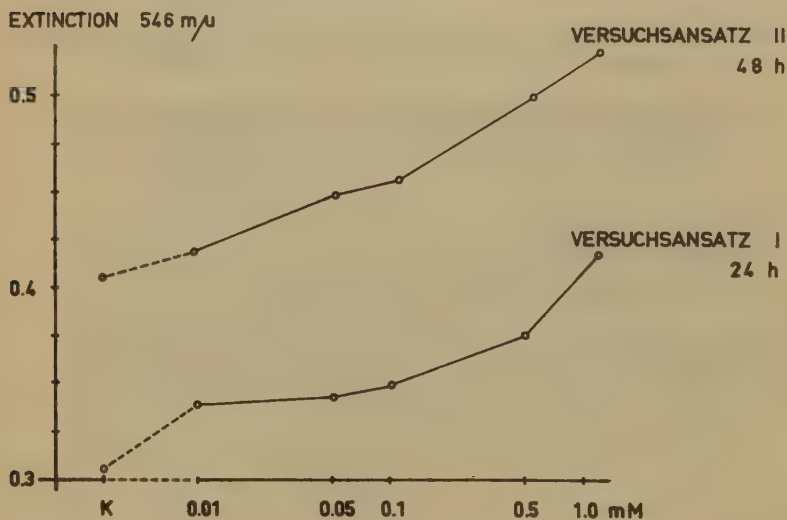


Abb. 4 Inkubation von Thymocyten (Kalb) in Prednisolonlösungen (0,01-1,0 mM)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich Lymphocyten und lymphoide Zellen, die beim Pfeiffer'schen Drüsenfieber im peripheren Blut vorkommen, lymphatisch leukämische Zellen und Thymocyten verschiedenen Hydrocortisonkonzentrationen gegenüber gleich verhalten; sämtliche Steroidkonzentrationen zwischen 0,01 und 5,0 mM schädigen nämlich die Zellen, uns kenntlich an dem vermehrten Thyrosingehalt des zellfreien Überstandes.

Mikroskopische Beobachtungen gehen mit diesen Befunden parallel. Je höher die Prednisolonkonzentration desto mehr morphologisch veränderte Zellen konnten wir finden, während die Kontrollansätze die größte Anzahl intakter Zellen aufwiesen. Die Veränderungen manifestierten sich als Pyknose, Karyorrhexis und Karyolyse der Zellkerne, die am nach Pappenheim gefärbten Präparat beobachtet wurden. Am ungefärbten Präparat zeigte sich im Phasenkontrastmikroskop eine vakuolige Veränderung des Plasmas.

2. Versuche mit neutrophilen Granulocyten und myeloisch leukämischen Zellen.

Die graphische Darstellung eines Versuches mit Leukocyten, davon 67% neutrophile Granulocyten, zeigen die Abbildungen 5 und 6.

EXTINCTION 546 m μ

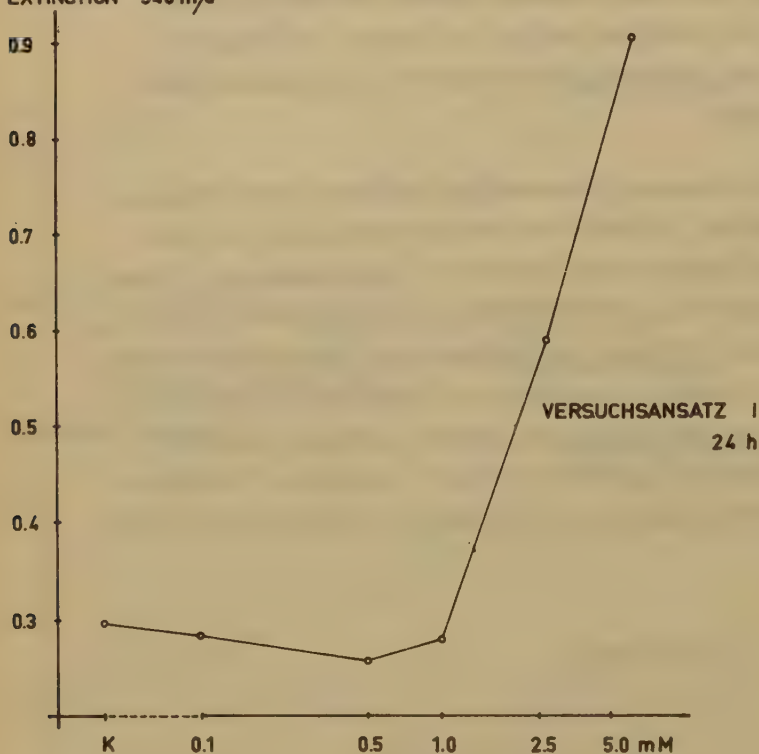


Abb. 5 Inkubation der Leukocyten eines Patienten mit Leukocytose von 12000/cmm (Cholangitis), davon 67% Neutrophile, in Prednisolon (0,1-5,0 mM)

EXTINCTION 546 m μ

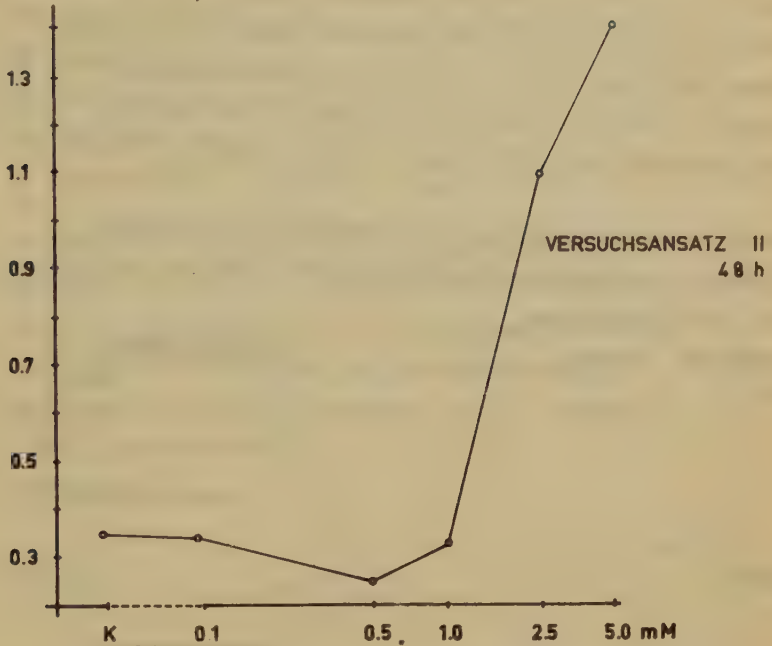


Abb. 6 Inkubation der Leukocyten eines Patienten mit Leukocytose von 12000/cmm (Cholangitis), davon 67% Neutrophile, in Prednisolon (0,1-5,0 mM)

Hier ergab sich, daß der Thyrosingehalt im Überstand mit steigender Prednisolonkonzentration zunächst fällt (0,01 bis 0,5 mM), um bei etwa 0,5 mM einen Tiefpunkt zu erreichen. Bei 1,0 mM war der Thyrosingehalt wieder angestiegen, lag aber noch unter dem Kontrollwert. Jedoch bei 2,5 und 5,0 mM übertraf die Thyrosinmenge im Überstand bei weitem die Kontrollen. Mit anderen

Worten bedeutet das, daß die Zellen der Ansätze 0,1, 0,5 und 1,0 mM in geringerem Maße zerstört werden als die der Kontrollen. Durch eine 0,5 mM Prednisolonkonzentration werden die Zellen am wenigsten geschädigt. Der Grad der Zellzerstörung ist bei 2,5 und 5,0 mM am höchsten.

Eine reinere Anreicherung der neutrophilen Granulocyten erhielten wir durch eine Leukocytose von 11000/cmm (Angina) mit 85% Neutrophilen.

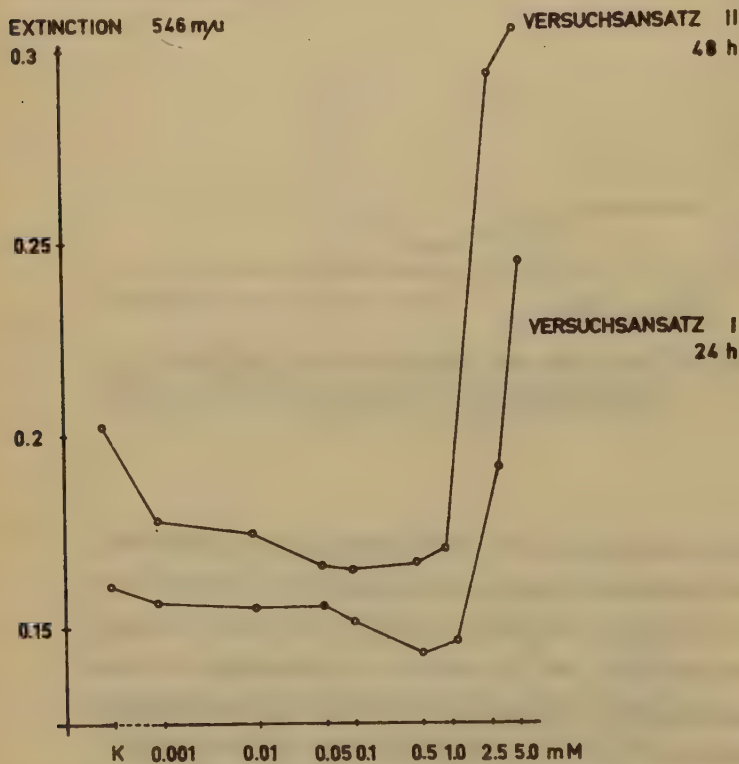


Abb. 7 Inkubation der Leukocyten eines Patienten mit einer Leukocytose von 11000/cmm (Angina), davon 85% neutrophile Granulocyten. Prednisolonkonzentrationen 0,001-5,0 mM.

Auch hierbei ergab sich klar wie Abbildung 7 zeigt, daß die Ansätze zwischen 0,001 und 1,0 mM weniger vom Zelluntergang betroffen sind als die Kontrollen. Der Grad der Zellzerstörung nimmt bei 0,5 mM ein Minimum an, steigt bei 1,0 mM wieder etwas an und liegt bei 2,5 und 5,0 mM wie im vorhergehenden Versuch weit über den Kontrollen.

Ausdrücklich sei bereits auf das unterschiedliche Verhalten der reifen und unreifen myeloischen Zellen hingewiesen, worauf in der Diskussion noch näher eingegangen werden wird. Typische Befunde von der Inkubation myeloisch leukämischer Zellen in Prednisolon sind in Abbildung 8 und 9 wiedergegeben.

EXTINCTION 546 m μ

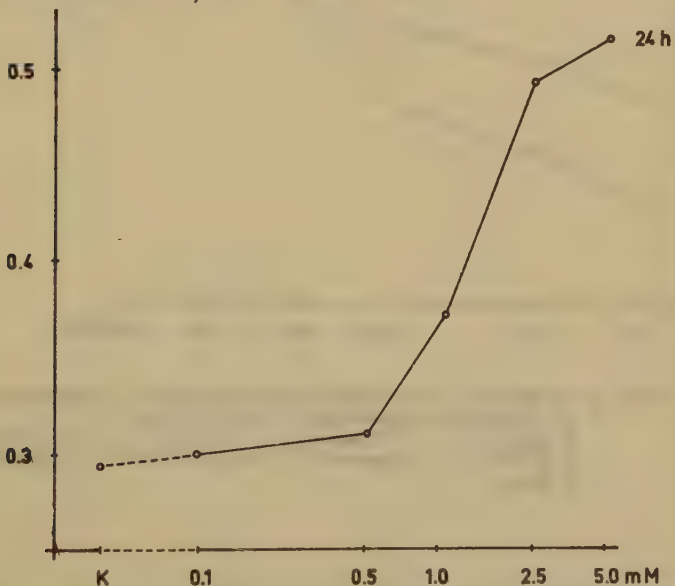


Abb. 8 Inkubation von Leukocyten (myeloische Leukämie) in Prednisolon (0,1-5,0 mM)
Diff.Blutbild: 2 Myeloblasten, 12 Promyelocyten, 26 Myelocyten, 18 Metamyeloc., 7 Stabk., 28 Segmentkernige, 2 Eo, 1 Baso, 4 Lymphoc.

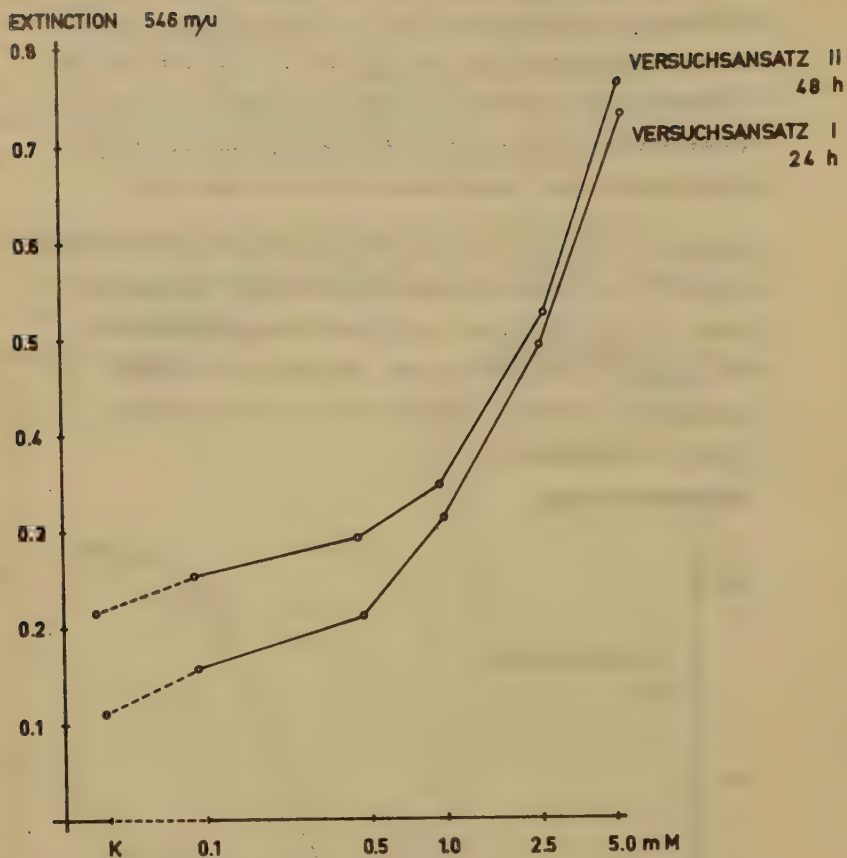


Abb. 9 Inkubation von Leukocyten (myeloische Leukämie)
in Prednisolonlösungen (0,1-5,0 mM)
8 Myelobl., 19 Promyeloc., 22 Myeloc., 16 metamyeloc.,
9 Stabk., 19 Segmentk., 2 Eo., 1 Baso., 3 Lympho.,
1 Mono.

Im Unterschied zu den reifen neutrophilen Granulocyten zeigt sich hier, daß die Leukämie-Zellen mit steigender Prednisolonkonzentration verstärkt zugrunde gehen, kenntlich am Ansteigen des Thyrosingehaltes im zellfreien Überstand.

Auch in den Versuchen mit neutrophilen Granulocyten bestätigte die mikroskopische Beobachtung die biochemischen Befunde. Die Rate der Vakuolig veränderten beziehungsweise mit Karyolyse behafteten Neutrophilen war in den Ansätzen mit 2,5 und 5,0 mM Konzentration besonders hoch, während bei 0,5 mM die morphologisch intakten Zellen vorherrschten.

3. Versuche mit Thrombocyten

Schließlich wurden Thrombocyten in verschiedenen starken Prednisolonlösungen inkubiert. Auch hier diente uns der Thyrosingehalt als Maß für den Grad des Zellunterganges. In Abbildung 10 ist ein solcher Versuch dargestellt.

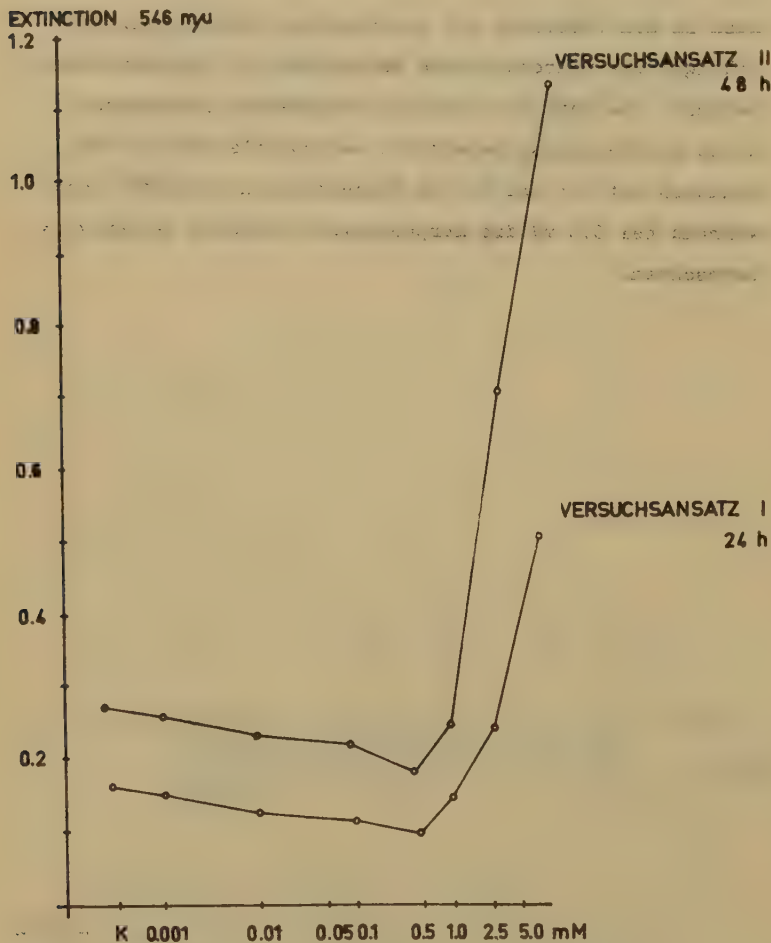


Abb. 10 Inkubation von Thrombocyten (Schwein) in Prednisolonlösungen (0,001-5,0 mM)

Auch hier ergab sich ganz eindeutig, daß bei bestimmten Konzentrationen Hydrocortison der Anteil der zerstörten Zellen geringer ist als in den Kontrollansätzen, und zwar ist er bei 0,5 mM am geringsten. Bei 2,5 und 5,0 mM werden die Thrombocyten verstärkt zerstört.

Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen weitere typische Versuchsergebnisse mit Thrombocyten.

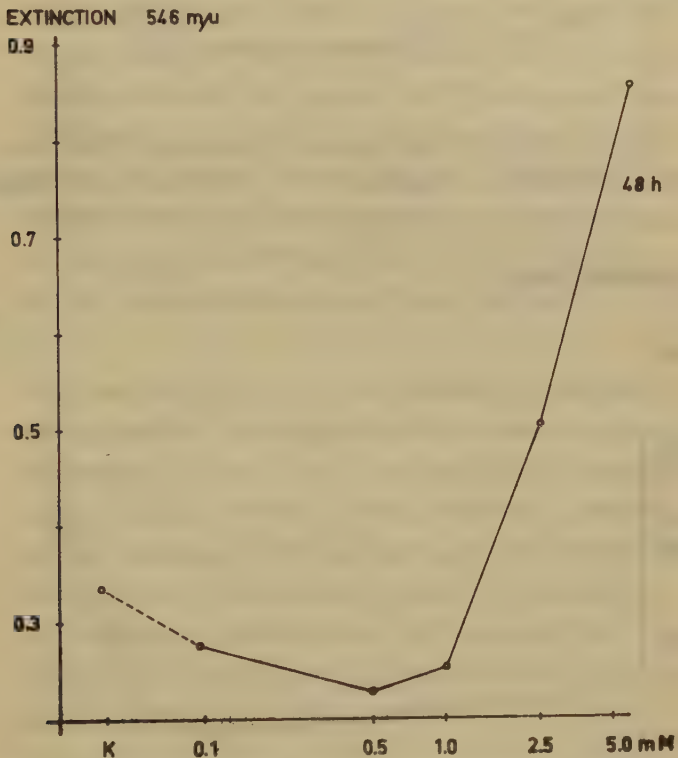


Abb. 11 Inkubation von Thrombocyten (Schwein) in Prednisolonlösungen verschiedener Konzentrationen (0,1-5,0 mM)

EXTINCTION 546 m μ

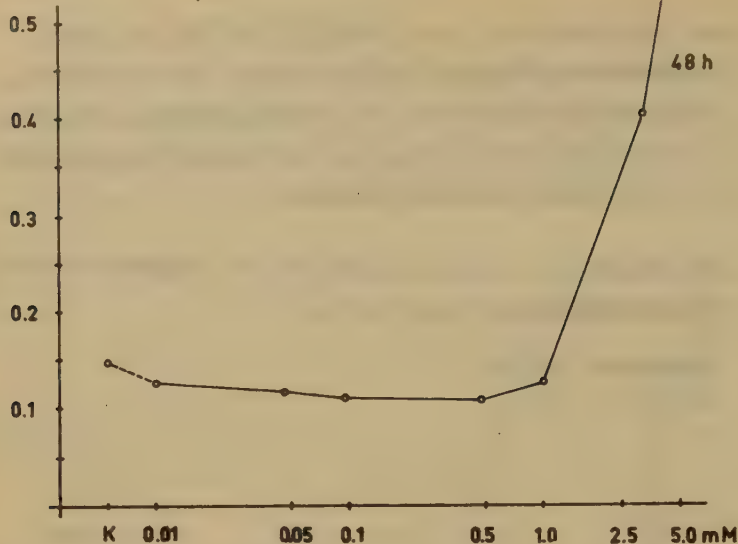


Abb. 12 Inkubation von Thrombocyten (Schwein) in Prednisolone-Lösungen (0,01-5,0 mM).

EXTINCTION 546 m μ

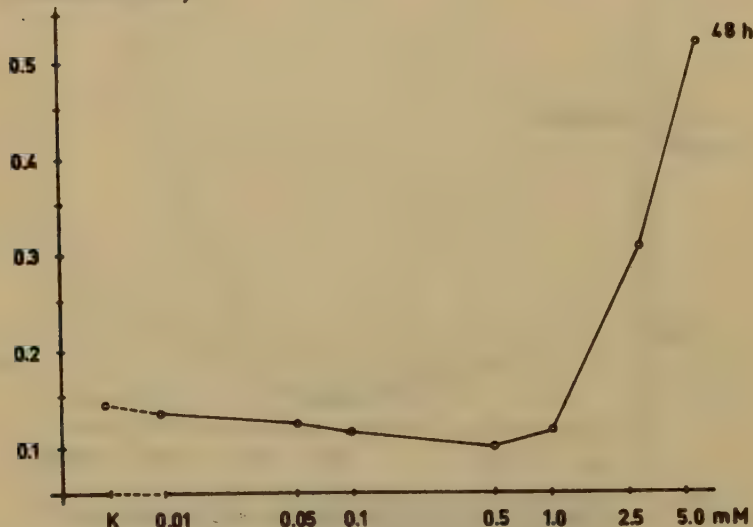


Abb. 13 Inkubation von Thrombocyten (Schwein) in Prednisolone-Lösungen (0,01-5,0 mM).

Wie die graphischen Darstellungen 11, 12, 13 zeigen, konnten wir auch hier wie in Versuch 10 feststellen, daß der Thyrosingehalt bei steigender Steroidkonzentration zunächst abfällt und etwa bei 0,5 mM einen Tiefpunkt erreicht. Bei 1,0 mM stieg die Thyrosinmenge wieder an, lag aber noch unter dem Kontrollwert. Bei 2,5 und 5,0 mM sind die Werte am höchsten. Wir erhielten mit Thrombocyten also die gleichen Resultate wie bei den Experimenten mit neutrophilen Granulocyten. Abschließend sei noch erwähnt, daß Versuche mit Humanthrombocyten prinzipiell die gleichen Ergebnisse lieferten. Sie konnten jedoch nicht in dieser Breite durchgeführt werden (bis zu 8 verschiedenen Konzentrationen in einem Ansatz), da begreiflicherweise die Ausbeute bei der Thrombocytenengewinnung zu gering war.

Kurz zusammenfassend sei hier nochmals festgestellt, daß Lymphocyten und lymphoide Zellen, sowie myeloisch-leukämische Zellen in vitro von steigenden Prednisolonekonzentrationen zerstört werden. Neutrophile Granulocyten und Thrombocyten werden nur durch Konzentrationen von 2,5 und 5,0 mM stärker geschädigt. Inkubationen mit niedrigen Konzentrationen von 0,001 bis 1,0 (Optimum bei 0,5 mM) mM zeigen hier einen geringeren Zelluntergang als die Kontrollen.

4. Versuche mit Bohnenkeimlingen

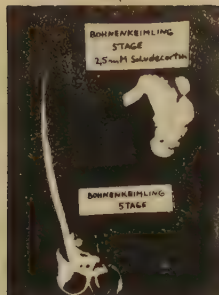
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war meine Fragestellung nicht auf Blutzellen beschränkt. Es interessierte vielmehr noch die Frage nach dem Verhalten pflanzlicher Zellen in Prednisolonlösungen verschiedener Konzentration. Das Protokoll eines Versuches mit 3-4 Tage alten Bohnenkeimlingen wird hier wiedergegeben:

Beobachtungen-Blatt:

Die Blätter sind nach der Vorkeimung nicht alle gleich weit entwickelt. Daher ergeben sich in den ersten Tagen unabhängig von der Konzentration der Steroidlösungen Unterschiede. Später (4.- 7. Inkubationstag) jedoch bleibt das Blattwachstum der „Steroidkeimlinge“ - besonders deutlich bei der höchsten Konzentration Prednisolon - gegenüber dem der Kontrollen zurück

Beobachtungen-Wurzeln:

Je höher die Steroidkonzentration, desto spärlicher ist die Entwicklung von Seitenwurzeln. Bei 5,0 mM sind nur ganz kurze Ansätze von Seitenwurzeln vorhanden und die Länge der Hauptwurzeln ist geringer als bei den Kontrollbohnen. Nach Einbringen dieser Keimlinge in aqua dest. sprießen innerhalb 1-2 Tagen Seitenwurzeln aus.



Gewicht-durchschnittliche Gewichtszunahme nach 2 Tagen:

Kontrollen	: 22%
1,0 epi-Hydrocortison	: 27%
2,5 epi-Hydrocortison	: 21%
5,0 epi-Hydrocortison	: 23%
1,0 Prednisolon	: 23%
2,5 Prednisolon	: 23%
5,0 Prednisolon	: 19%

Eine gesetzmäßige Beeinflussung der H_2O -Aufnahme durch die beiden Steroide-11-epi-Hydrocortison und Prednisolon- ist nicht zu erkennen. Die Unterschiede der Werte liegen innerhalb der Fehlergrenze.

Histologie der Wurzeln:

Histologisch zeigen die Haupt- und Seitenwurzeln der Kontrollen, 1,0-Ansätze und 2,5-Ansätze einen normalen Aufbau. Bei den Keimlingen in 5,0 mM Lösung kamen keine Wurzelhaare zur Entwicklung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die auffallendste Wirkung des Prednisolons auf den Bohnenkeimling darin besteht, die Ausbildung von Seitenwurzeln weitgehend zu unterdrücken. Deutlich, jedoch in geringerem Maße, wird auch die Entwicklung des Blattes gehemmt.

Das Verhalten der Blutzellen gegenüber Nebennierenrindenhormonen ist in vitro nur selten untersucht worden. Einige wenige Beobachtungen liegen von den Lymphocyten vor.

Eine Zerstörung der Lymphocyten in vitro durch Nebennierenrindenhormone erzielten Frank und Dougherty (28), und zwar mit Plasma als Inkubationsmedium. Frank setzte pro ml Plasma 1 mg Hydrocortison oder Cortison zu und stellte bereits nach einer Inkubationsdauer von 30 sec. zwölfmal soviel degenerierende ("budding") Lymphocyten fest als im Kontrollplasma. Diese knospenden Lymphocyten können sich nach Waschen und Resuspendieren in cortisonfreiem Plasma zu normalen Zellen zurückbilden. Verbleiben sie jedoch im Cortisonplasma, so fallen sie der Pyknose und Karyorrhesis anheim. Ebenfalls beobachtete Trowell eine Lymphocytolyse in vitro, nämlich in Gewebekulturen und erzielte noch mit 0,1 gamma/ml Cortison eine gesteigerte Lymphocytenzerstörung, die durch Zählung festgestellt wurde. Auch Schreck (29) erhielt mit hohen Dosen Cortison eine Lymphocytolyse in vitro, lediglich mit Ringer-Lösung als Inkubationsmedium. Feldmann (30) gelang es, eine Lymphocytenzerstörung in vitro durch Dehydrocorticosteron und Nebennierenrindenextrakte in Konzentrationen zwischen 1,6 und 3,2 mM nachzuweisen. Mit Plasma und physiologischer Kochsalzlösung als Medium erhielt Feldmann das gleiche Ergebnis.

Die geschilderten Resultate von Frank und Dougherty (28), Schreck (29) und Feldmann (30), nämlich eine verstärkte Lymphocytenzerstörung in

vitro durch Cortison oder andere Nebennierenrindenhormone auszulösen, liessen sich mit unserer Versuchsanordnung reproduzieren. Aus der Tatsache, dass wir lediglich physiologische Kochsalzlösung als Inkubationsmedium verwandten, lässt sich schliessen, dass der unmittelbare Angriffspunkt des Steroids die Zelle selbst sein muss und dass es zu seiner Wirkung keines weiteren Co-Faktors bedarf. Diesen Befunden widersprechende Ergebnisse erhielten Osgood und Krippaehne (31), Robertson (32), Mertens und Ehrichs (33). Osgood und Krippaehne (31) konnten bei Zusatz von 10 - 20 γ /ml oder 10 γ /ml Hydrocortison zu Kulturen menschlicher Leucocyten während 8 Tagen keinen Einfluss auf Untergang und Morphologie der Zellen feststellen. Lymphopenie wurde nicht beobachtet. Robertson inkubierte Lymphocyten der Ratte in Serum mit Nebennierenrindenextrakt und beobachtete ebenfalls keine gesteigerte Lymphocytolyse. Die negativen Resultate Osgoods (31) und Robertsons (32) lassen sich auf zu geringe Steroidkonzentrationen zurückführen, denn eine signifikante Lymphocytenzerstörung ergab sich auch in unseren Experimenten erst bei einer Konzentration von 0,1 mM, also der 2,5 - 5-fachen Dosis, die die genannten Autoren verwandten. Reiss, Mertens und Ehrich (33) berichten, dass in vitro gewaschene Lymphocyten durch 50 γ /ml Cortison unbehelligt blieben. Die genannten Forscher beobachteten die Lymphocyten jedoch nur einige Minuten unter dem Mikroskop. Daher ist ihr negatives Ergebnis mit dem unseren, das ja auf Grund von Dauerinkubation über 24 und 48 Stunden gewonnen wurde, nicht vergleichbar.

Die schädigende Wirkung des Hydrocortisons macht sich nicht nur bei den Lymphocyten bemerkbar, sondern auch bei den unreifen myeloischen Zellen. Steigende Konzentrationen von Hydrocortison (0,1 - 5,0 mM) lösen in vitro verstärkt myeloisch-leukämische Zellen auf. Wir vermuten daher, dass die günstige Beeinflussung der akuten Leukämie durch Cortison wenigstens z. T. auf diese Tatsache zurückzuführen ist.

Auf welche Weise aber können wir uns die neutrophile Leukocytose nach vermehrter Nebennierenrindenhormonausschüttung oder Cortisonbehandlung erklären? Auch hier gehen die mit unserer einfachen Versuchsanordnung gewonnenen Resultate einen Hinweis. Wir haben festgestellt, dass die in niedrigen Konzentrationen von Hydrocortison (0,001 - 1,0 mM) inkubierten Leukocyten nach 24 und 48 Stunden eine geringere Absterberate aufweisen, als die der Kontrollen. Das bedeutet, dass bestimmte Konzentrationen von Prednisolon geeignet sind, die Überlebenszeit von neutrophilen Granulocyten zu verlängern. Dabei hat sich in vitro die Konzentration von 0,5 mM als optimal erwiesen. Die bei der Therapie gebräuchlichen unphysiologisch hohen Dosen rechtfertigen den Vergleich der klinischen Beobachtungen mit den Ergebnissen unserer Versuchen, in welchen noch bei 0,01 und 0,001 mM der lebensverlängernde Effekt des Steroids auf die neutrophilen Granulocyten nachzuweisen war.

Auch das Verhalten der Thrombocyten in vitro weist auf die von einigen Autoren beschriebene Thrombocytenvermehrung im Blut während einer Cortisonbehandlung hin. Wir fanden

nämlich, dass niedere Prednisololkonzentrationen die Auflösung von Thrombocyten in vitro verhindern. Der Anstieg der Blutplättchenzahlen nach Cortison könnte also ebenfalls auf eine längere Lebenszeit derselben zurückgeführt werden.

Es sei nochmals betont, dass wir un. bemisst sind, dass die beschriebenen Blutbildveränderungen bei Cortisonbehandlung durch das Zusammenwirken mehrerer verschiedener Mechanismen im Organismus zustande kommen. Auch die typischen Blutbilder der Nebennierenrindenüberfunktion und der Nebennierenrindenunterfunktion, des Morbus Cushing und des Morbus M. Addison, kann man sicher nicht nur an Hand unserer in vitro gewonnenen Ergebnisse erklären. Neutrophile Leukocytosen beim Morbus Cushing wurden von Daughaday, Williams und Daland (34) beschrieben. Baez-Villasenor und Mitarbeiter (35) fanden beim Addison fast regelmässig eine Leukopenie. Daughaday (34) und Mitarbeiter, Baez-Villasenor (35), Rat und Finch bezeichnen die Lymphocytose und Eosinophile der Addison'schen Erkrankungen als charakteristischen Befund, ebenso die Lymphopenie und die Eosinopenie des Cushing. Ein typisches Addisonblutbild kann auch während der Substitution mit 17-oxy-Steroiden in das des Morbus Cushing umschlagen. Es entsprechen auch diese klinischen Befunde den Resultaten unserer in vitro-Versuche, nämlich Vermehrung der Neutrophilen und Verminderung der Lymphocyten unter Cortison.

Wo und auf welche Weise greift nun das Cortison an der Zelle an? Um diese Frage zu beantworten, müssen wir die hemmende Wirkung verschiedenster Steroide auf den Zellstoff-

Wechsel in Betracht ziehen. Sowohl an Mäuseasciteszellen wie an Schweineleukocyten liess sich mit Prednisolon ein verminderter Sauerstoffverbrauch feststellen (F i s c h e r) (36). Desoxycorticosteron, Dehydroandrosteron, Methyltestosteron und Testosteron hemmen übereinstimmend die O_2 -Aufnahme von Leber, Niere - und Gehirnschnitten (H a y a n o , S c h i l l e r u n d D o r f m a n n) (37). Die aerobe und anaerobe Milchsäurebildung und der O_2 -Verbrauch der Synovia werden in vitro durch Hydrocortison vermindert (P a g e , T h o m a s u n d D i n g l e) (38). Mit einer Anzahl der verschiedensten Steroide liessen sich mannigfache Zellstoffwechselvorgänge - unter anderem der Lymphocyten - hemmen; z.B. Atmung, Wachstum, Oxydation von Kohlehydraten und die Aufnahme von dem Inkubationsmedium zugefügten Aminosäuren (B l e c h e r u n d W h i t e) (39). Die naheliegende Vermutung, der Grund für die Stoffwechselwirkung der Steroide sei in der unmittelbaren Hemmung einzelner, spezifischer Fermentsysteme zu suchen, hat sich bisher nicht eindeutig beweisen lassen. Wohl liess sich die Wirkung einiger Fermente (z.B. der Transaminase) mittels Steroide hemmen (B l e c h e r u n d W h i t e) (39). Sogar in zellfreien Kernsuspensionen konnte die Aufnahme von Aminosäuren in die Nukleinsäuren durch Steroide verhindert werden. Jedoch ist es niemals gelungen, in vitro ein isoliertes Coferment durch ein Steroid zu hemmen.

Eine Antwort auf die hier aufgezeigten Probleme können Experimente anderer Art geben, nämlich die Verhinderung der Aufnahme von Zellgiften durch Steroide: Mäuseasciteszellen werden durch den cytotoxischen Eiweisskörper Protamin ver-

giftet. Jedoch wird das Eindringen von Protamin durch steigende Konzentrationen von Prednisolon verhütet (F i s c h e r)(36). Auch die Aufnahme von 6wertigem Chrom durch Erythrocyten, ein rein physikalisch-chemischer Vorgang, wird durch höhere Prednisolonkonzentrationen verringert. (F i s c h e r , F r i t z s c h e)(36). Auch die Hämolyse menschlicher Erythrocyten, sei sie hervorgerufen durch Schlangengifte (Z e l l e r)(40) oder durch im Serum vorhandene Cytolysine (F i s c h e r)(36), wird durch höhere Cortisondosen gehemmt. Ebenso kommt Brucella-Antigen, welches die Eigenschaft hat, die Körpertemperatur zu senken, bei gleichzeitiger Injektion von verschiedenen Glukocorticoiden, nicht oder nur ganz allmählich zur Wirkung (H a l b e r g , S p r i n k und B i t t n e r)(41).

Die zuletzt aufgezählten Befunde aber sprechen stark für eine permeabilitätseinschränkende Wirkung der Steroide auf die Zellmembranen. Für diese Ansicht finden sich in der Literatur einige Hinweise. Als einer der ersten Forscher bezeichnete S z e n t - G y ö r g i i (42) die Steroidhormone als wichtige Regulatoren der Zellpermeabilität. Einige neuere Argumente brachte T a l a l a y (43), der eine Affinität der Steroide zu Zelloberflächen und "inneren" Grenzmembranen annimmt. Dieser Hypothese schliesst sich auch W i l l e m e r (44) an, der eine Verbindung der Steroide mit den Phospholipiden der Zelloberfläche und der Grenzmembranen der Zellorganellen vermutet. Die spezifische Wirkung der verschiedensten Steroide hänge von ihrem molekularen Bau ab. So seien für die Wirkung der Östrogene phenolische Hydroxylgruppen, der Androgene alkoholische

Hydroxylgruppen, des Progesterons keto-Gruppen und der Adrenocorticosteroide alpha-ketol-Gruppen verantwortlich. Allen physiologisch wirksamen Steroiden aber sei gemeinsam der Angriffspunkt an den Zellgrenzmembranen.

Der Einfluss des Cortisons kann also auf einer Abdichtung der Äusseren (Zellgrenzmembran) wie der inneren (Grenzmembranen der Kerne und der Mitochondrien) Zellhüllen gegen eindringende Stoffe, auch gegen Sauerstoff, beruhen. Daraus ergibt sich eine Drosselung des gesamten Zellstoffwechsels. Diese permeabilitätsverringende Wirkung kommt nun nicht nur dem Hydrocortison unserer Versuche zu, sondern bei genügend hoher Dosierung mehreren Steroiden. Der Grund hierfür liegt wohl in der weitgehenden Übereinstimmung der Konfiguration der Moleküle dieser Stoffgruppe. Es könnte sich also bei der gemeinsamen Wirkung verschiedenster hochdosierter Steroide um eine Abdichtung der Zellgrenzmembranen handeln, also in erster Linie um einen physikalisch-chemischen Vorgang, wobei nicht ausgeschlossen ist, dass auch an diese Strukturen gebundene Fermente ihre Eigenschaften verändern.

Wie aber lassen sich nun die Ergebnisse unserer Experimente mit dieser Hypothese in Zusammenhang bringen ? Durch die Inkubation mit Hydrocortison wird der Stoffwechsel der neutrophilen Granulocyten und der Thrombocyten gehemmt und bei 0,5 mM auf ein mit dem Überleben vereinbares Minimum herabgedrückt. Die Folge davon ist ein Herauszögern des natürlichen Alterns und Absterbens der Zellen und damit eine längere Überlebenszeit. Konzentrationen von 2,5 und 5,0 mM hemmen jedoch Transport- und Stoffwechselvorgänge so stark,

dass die Zellen vermehrt zugrunde gehen. Die auf einen grösseren Stoffwechsel angewiesenen unreifen, leukämischen Zellen reagieren daher empfindlicher und sterben bereits bei niedrigen Konzentrationen ab.

Was die Lymphocyten betrifft, so gibt es zwei Möglichkeiten, ihre Zerstörung durch Cortison zu erklären. Erstens wäre es denkbar, dass die Lymphocyten, das heisst ihre Grenzflächen eine stärkere Affinität zu den Steroidmolekülen besässen als die anderen Blutzellen. Daraus ergäbe sich eine noch intensivere Abdichtung gegen eindringende Stoffe, also auch gegen den Sauerstoff, und damit eine so starke Drosselung der Stoffwechselvorgänge, die die Erstickung der Zelle bedingen würde. Zweitens könnte die Empfindlichkeit der Lymphocyten gegen eine Herabsetzung ihres Stoffwechsels über längere Zeit so beträchtlich sein, dass eine Dauerinkubation über 24-48 Stunden den Zelltod zur Folge haben müsste. Dieser Umstand würde auch - wie bereits erwähnt - das negative Ergebnis Re i s s , M e r t e n s und E h r i c h s (33) erklären, die die in Cortison inkubierten Lymphocyten nur einige Minuten unter dem Mikroskop beobachteten. --- Welche der hier kurz aufgezeigten Möglichkeiten einer Erklärung der Lymphocytolyse auch bei niedrigen Steroidkonzentrationen in Betracht kommt, müsste in weiteren Forschungen geklärt werden.

Wie bereits gesagt, bezieht sich unsere Fragestellung nicht nur auf das Verhalten von Blutzellen in Prednisolonlösungen, sondern auch von pflanzlichen Zellen. Die auffälligste Veränderung der in Steroidlösungen keimenden Bohnen ist die

geringere bzw. fehlende Ausbildung von Seitenwurzeln und sekundär das Zurückbleiben des Blattwachstums.

Liegt nun der Wirkung der Prednisolons auf Blutzellen und auf Pflanzenzellen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde ?

Ein Grund für die Hemmung der Wurzelentwicklung bei dem Bohnenkeimling könnte in einer behinderten Aufnahme von Wasser, das ja bei der Keimung eine bedeutende Rolle spielt, zu suchen sein. Der osmotische Druck der Steroidlösungen kann bei dieser Überlegung vernachlässigt werden, da er bei einer 5,0 mM Lösung nur 0,2 Atm. beträgt gegenüber 2 - 3,5 Atm. Saugkraft der Wurzeln. Betrachten wir nun die Gewichtszunahme der Keimlinge, so stellen wir fest, dass diese in den ersten beiden Tagen bei allen Ansätzen etwa gleich gross ist.

Der Bohnenkeimling in Cortisonlösung nimmt also reichlich Wasser auf, besitzt genügend Nährstoffe in seinen Keimblättern und ist doch - je nach Konzentration - nur gering oder überhaupt nicht imstande, Seitenwurzeln zu entwickeln. Mit unserer Versuchsanordnung sind wir nicht in der Lage, diese Tatsache zu erklären. Jedoch neigen wir bei diesen hohen Steroidkonzentrationen dazu, ebenfalls eine Grenzflächenveränderung im Sinne einer Abdichtung anzunehmen. Aus einer solchen Permeabilitätsverringerung aber würde eine Erschwerung der Mobilisation von Nährstoffen resultieren, die wiederum einen stark reduzierten Stoffwechsel zur Folge hätte. Ein niedriges Stoffwechsellniveau bedeutet aber für den Keimling eine starke Verzögerung seiner Entwick-

lung, die für uns sichtbar darin ihren Ausdruck findet, dass die Ausbildung von Seitenwurzeln gebremst wird oder unterbleibt, ebenso wie die Entstehung von Differenzierungen der Epidermis, den Wurzelhaaren.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Die Beeinflussung des peripheren Blutbildes durch Cortison oder andere antiphlogistisch wirkende Corticosteroide ist mehrfach beschrieben worden. Bekannt sind die neutrophile Leukocytose, die Vermehrung der Thrombocyten, die Verminderung der Lymphocyten und der Eosinophilen unter der Therapie mit Cortison. Diese von einer Reihe von Autoren beobachteten Veränderungen des peripheren Blutbildes veranlaßten uns, die Steroidwirkung auf neutrophile Granulocyten, Thrombocyten und Lymphocyten in vitro zu untersuchen. Unsere genaue Fragestellung war: Läßt sich ein beschleunigter oder verzögerter Abbau der in vitro in Prednisolonlösungen inkubierten Blutzellen beobachten?

Die Blutzellen wurden in Prednisolonlösungen verschiedener Konzentration (0,01-5,0 mM) 24-72 Stunden bei 37° C inkubiert. Mit Hilfe einer einfachen biochemischen Reaktion nach Folin-Ciocalteu untersuchten wir als Maß der Zellschädigung die Menge des infolge von Zelltod und Proteolyse freigewordenen Thyrosins.

Es ergab sich, daß menschliche Blutlymphocyten, lymphoide Zellen (Pfeiffer'sches Drüsenfieber) und unreife myeloische Zellen, sowie Kalbsthymocyten schon durch niedrigste Konzentrationen Prednisolon zerstört werden, so daß die Kontrollansätze nach Abschluß der Dauerinkubation die geringste Absterberate aufweisen. Neutrophile Granulocyten und Thrombocyten werden dagegen erst durch hohe Konzen-

trationen zwischen 2,5 und 5,0 mM Prednisolon stärker geschädigt. Versuchsansätze mit niedrigen Konzentrationen zwischen 0,01 und 1,0 mM (Optimum bei 0,5 mM) zeigen hier einen geringeren Zelluntergang als die Kontrollen. Der Einfluß des Cortisons auf den Zellstoffwechsel ließ sich nun nicht nur in der Verfolgung des Zelltodes beobachten, sondern auch bei Pflanzenkeimung- und Differenzierung. Als Versuchsobjekt erwies sich der Bohnenkeimling als besonders geeignet. Konzentrationen von 1,0-5,0 mM hemmten hier die Keimung, ohne den Keimling permanent zu schädigen, der sich nämlich nach Einbringen in steroidfreies Wasser normal entwickelte.

Unsere Ergebnisse stehen damit in Übereinstimmung mit den in vivo-Befunden von Dougherty, Finch, Dury, Hills, Köller und anderen, die nach Cortisonbehandlung einen Abfall der Lymphocyten beziehungsweise einen Anstieg der neutrophilen Granulocyten und der Thrombocyten im peripheren Blut fanden. Auch die bei in vitro-Versuchen gewonnenen Resultate von Schrek, Feldmann, Hayano, Blecher und anderen lassen sich mit unseren Ergebnissen, nämlich einer zellkonservierenden Wirkung von Prednisolon auf neutrophile Granulocyten und Thrombocyten und einem verstärkten Lymphocytenabbau in Einklang bringen. Die gewonnenen Ergebnisse unserer in vitro-Versuche können im Sinne der Hypothese der permeabilitätsändernden Wirkung der Steroide (Szent-Györgii, Talalay, Willemer), wonach die Mehrzahl der Stoffwechselfunktionen der Zelle durch Cortison gehemmt wird, gedeutet werden. Jedoch muß eine Stützung dieser Hypothese weiteren experimentellen Forschungen vorbehalten sein.

L I T E R A T U R

1. Dougherty, T.F. Ann.N.Y.Acad.Sc.56 (1953), '48
2. Valentine, W.N., Craddock, C.G.Jr. u. Lawrence, J.S. Blood 3 (1948), 729
3. Hills, G.A., Forsham, P.H. u. Finch, C.A. Blood 3 (1948), '55
4. Finch, S.C., Crockett, C.L.Jr., Ross, J.F. u. Bayles, T.B. Blood 6 (1951), 1034
5. Quittner, H., Wald, N., Sussmann, L.N. u. Antopol, W. Blood 6 (1951), 513
6. Wenck, U. u. Speirs, R. Acta haemat.Basel, 17(4) April (1957)
7. Grundmann, E. Klin.Wschr.37 (1959), 941
8. Gerstner, R. u. Gordon, A. Amer.J.Physiol.194(3) (1958), 485
9. Bunim, J.J., Pechet, M.M. u. Bllet, A.J.J. Amer.Med.Ass.157 (1955), 311
10. Girod, C., Sem.hop, Paris 5 (1957), 1167
11. Thorn, G.W., Forsham, P.H., Prunty, F.T.G. u. Hills, A.G. J.Amer.Med.Ass.137 (1948), 1005
12. Yoffey, J.M. Journal Anat. (1954) London 88, 115
13. Larizza, P. Haemat.Pavia 39 (1955), 85 u.149
14. Dury, A. Amer.J.Phys. 160, (1950), 75
15. Laves, W. Verh.deut.Ges.innere Med.58 (1952), 777
16. Girod, C., Domenech, A. u. Slimane-Taleb, S. Comptes rendus Societe de biologie 149 (1955), 1543
17. Aschkenasy, A. Sem.Hop.Paris 28 (1952), 1125
18. Stevens, J.E. u. Toone, E.C.Jr. South.Med.J.45 (1952), 738
19. Heilmeyer, L. Handbuch der ges. Hämatologie, Band II Allg.Hämat. 2.Teil, 1.Halbband, 253
20. Cramer, R. Acta haemat.8 (1952), 209
21. Groß, R. u. Ludwig, H. Kli.Wo.34 (1956), 1117

- 22.de Takats,G. Surgery 14, (1943),661
- 23.Köller,F. u.Zollikofer,H. Experientia Basel 4 (1950),299
- 24.Coste,F.,Laurent,F. u.Delbarre,F. Compt.rend.Soc.biol.
Paris 145 (1951),838
- 25.Bounameaux,Y. Acta haemat.12 (1954),322
- 26.Oberdisse,K. Deut.Med.Wschr. (1958),1457 u.1538
- 27.Hansen,H.G. Die Medizinische (1958),191
- 28.Frank,J. u.Dougherty,T.F. Proc.Soc.exp.biol.a.med. 82
(1953),17
- 29.Schrek,R. Proc.Soc.exp.biol.a.med. 77 (1951),709
- 30.Feldmann,J.D. Endocrinologie 46 (1950),552
- 31.Osgood,E.E. u.Krippaehne,M.L. Acta haemat. 13 (1955),145
- 32.Robertson,J.S. Nature 161 (1948),814
- 33.Reiss,E.,Mertens,E. u.Ehrich,W. Proc.Soc.exp.biol.a.med.
74 (1950),732
- 34.Daughaday,W.H.,Williams,R.H. u.Daland,G.A. Blood 3
(1948),1342
- 35.Baez-Villasenor,J.,Rath,C.E. u.Finch,C.A. Blood 3 (1948),
769
- 36.Fischer,H.,Argenton,H. u.Fritzsche,W. 7.Freib.Symp.d.Ges.
Deut.Hämat.über Hämolysen u.hämolyt.Erkrank. Okt.1959
- 37.Hayano,M.,Schiller,S. u. Dorfmann,R.I. Endocrinologie 46,
(1950),387
- 38.Page,T.D.P.,Dingle,J.T. Biochem.J. 68 (1958),231
- 39.Blecher,M. u.White,A. Proc.of the Laurentian Hormone Conf.
(1958),Academic Press 1959,391
- 40.Zeller,E.A. Federation Proc. 11,(1952), 316

- 41. Halberg, F., Sprink, W.W. u. Bittner, J.J. Endocrinology 59
(1956), 380
- 42. Szent-Györgyi, A. Int. Symp. Montreal (1953), 15 Acta Inc.
1953
- 43. Talalay, P., Hurlock, B. u. Williams-Ashman, H.G. Proc. Natl.
Acad. Sci. 44, (1958), 862
- 44. Willemer, E.N. Biol. Rev. 36 (1961), 368-398

Herrn Prof.Dr.med.H.Fischer danke ich herzlich für die
Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der
Ausführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 21. März 1936 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern in Frankfurt am Main geboren. Im Herbst 1942 wurde ich in die Volksschule in Frankfurt am Main-Römerstadt eingeschult. Einen Teil der Kriegsjahre verbrachte ich bei meinen Großeltern in Norddeutschland. Im Jahre 1946 wurde ich in die Sexta der Elisabethen-Schule, Realgymnasium für Mädchen, in Frankfurt aufgenommen. Im Frühjahr 1955 machte ich an der gleichen Schule das Abitur. Danach begann ich mein Medizin-Studium an der hiesigen Johann Wolfgang Goethe-Universität, wo ich im Herbst 1957 das Physikum machte. Im 3. klinischen Semester, im Winter 1957/58, studierte ich in Wien. Im Sommer 1961 beendigte ich mein Studium mit dem Staatsexamen in Frankfurt am Main. Seit September 1961 bin ich an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik in Frankfurt am Main als Medizinalassistentin tätig.

